

Esterasas de *Lactobacillus plantarum* utilizables en la elaboración de alimentos

M. Esteban-Torres, B. de las Rivas, R. Muñoz*

Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid

*Autor para la correspondencia: r.munoz@csic.es

Resumen

Los ésteres son compuestos aromáticos presentes en los alimentos. A pesar de encontrarse en bajas concentraciones, los ésteres son muy importantes en el perfil aromático de los alimentos. Las esterases son las enzimas encargadas de catalizar las reacciones tanto de hidrólisis como de síntesis de los ésteres en función de las condiciones de reacción. En este trabajo se presenta un resumen actualizado del conocimiento de estas enzimas en *Lactobacillus plantarum*, cultivo iniciador modelo en la fermentación de alimentos vegetales. Las propiedades bioquímicas específicas presentadas por las esterases identificadas permite la disponibilidad de variadas enzimas con alto potencial biotecnológico y comercial, que se pueden utilizar en la elaboración de aditivos alimentarios o alimentos con características sensoriales mejoradas.

Summary

Esters are flavour compounds that occur in a variety of food products. In spite of their low concentrations, esters are extremely important for the flavour profile of foods. Esterases comprise enzymes that might catalyze both hydrolytic and synthetic of esters depending on the reaction condition. This work presents an updated summary of the knowledge of these enzymes in *Lactobacillus plantarum*, the model of starter bacteria for vegetable fermentations. The specific biochemical properties exhibited by the identified esterases allow the availability of various enzymes possessing high biotechnological and commercial value, and useful in the elaboration of additives or food products with improved sensorial characteristics.

Ésteres en alimentos

Los microorganismos y sus enzimas desempeñan un papel clave en la elaboración de numerosos alimentos. La fermentación se utiliza desde hace siglos para la elaboración de productos lácteos, cárnicos, bebidas, encurtidos y pan, entre otros alimentos. La fermentación de los alimentos es un proceso biotecnológico sencillo que se utiliza para mantener o mejorar la seguridad, propiedades nutricionales y sensoriales así como también la vida media de los alimentos (1). La obtención de alimentos fermentados con las características organolépticas adecuadas para que sean apreciados por los consumidores depende del desarrollo de los microorganismos adecuados. Además de las reacciones necesarias para llevar a cabo la fermentación, durante este proceso se sintetizan, degradan o modifican enzimáticamente compuestos, como por ejemplo los ésteres, que afectan a las características organolépticas finales de los alimentos (2).

Los ésteres son compuestos presentes en los alimentos, los cuales son determinantes para el aroma y, por extensión, para la calidad de los mismos (3). Estos compuestos son moléculas lipofílicas formadas por un alcohol y un ácido carboxílico. A pesar de que la mayoría de los ésteres se encuentran en bajas concentraciones, éstos son muy importantes en el perfil aromático

de los alimentos (vino, queso, embutidos fermentados, pan, etc.). Por ejemplo, en el vino los ésteres son responsables del deseado aroma afrutado de los vinos jóvenes, sin embargo, también presentan un efecto negativo cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas (4). En el vino existen dos grupos principales de ésteres, los ésteres de acetato y los ésteres de etilo de ácidos grasos de cadena media (4). Entre los ésteres de acetato se encuentran el acetato de etilo (aroma a piña), acetato de isoamilo (aroma a plátano), acetato de isobutilo (aroma afrutado) y acetato de feniletilo (aroma a rosas, miel). En el segundo grupo de ésteres, se encuentran el hexanoato de etilo (aroma afrutado, a violetas), octanoato de etilo (aroma a piña, pera), caprilato de etilo (olor a manzana ácida) y decanoato de etilo (aroma floral) (2). Por otro lado, los ésteres también son compuestos muy importantes en las características sensoriales de otros alimentos fermentados como el queso o productos cárnicos. La hidrólisis de los lípidos, como los triglicéridos, origina ácidos grasos que contribuyen directamente a las características sensoriales de los alimentos fermentados (5). Los ácidos grasos son compuestos sensoriales importantes por sí mismos, pero además son compuestos precursores de otros ésteres volátiles (6). En alimentos de origen vegetal, son abundantes los ésteres de compuestos fenólicos, como los ésteres de ácidos hidroxibenzoicos como el ácido gálico y de ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico. La Figura 1 muestra la estructura de algunos de los ésteres más importantes en alimentos.

Esterasas: aplicaciones en la industria alimentaria

La acumulación de ésteres en los alimentos es el resultado del balance entre las reacciones de síntesis y de hidrólisis de las enzimas esterasas presentes (4). Las esterasas (EC 3.1.1.x), son un tipo de enzimas hidrolasas muy importantes en biotecnología. Entre las esterasas, se pueden distinguir carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), arilesterasas (EC 3.1.1.2) y lipasas (EC 3.1.1.3) (7). Las carboxilesterasas y las arilesterasas catalizan típicamente la hidrólisis de ésteres alifáticos solubles en agua de cadena corta o media, y las últimas se distinguen por su preferencia por la hidrólisis de ésteres fenólicos. Por el contrario, las lipasas generalmente presentan actividad frente a ésteres de cadena larga e insolubles en agua (8). Otras esterasas implicadas en el metabolismo de ésteres de ácidos fenólicos son las enzimas **denominadas “taninasas” (tanin acil hidrolasas)** (EC 3.1.1.20) que actúan sobre los ésteres del ácido gálico (9) y las feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) que generalmente hidrolizan el enlace éster entre los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares de las paredes celulares vegetales (10). Las esterasas son enzimas muy útiles en las industrias alimentarias (láctea, cárnica, enológica, encurtidos, etc) (11), además, las esterasas de compuestos fenólicos se utilizan para la obtención de aditivos antioxidantes de alto valor añadido, como el ácido gálico o el galato de propilo (12).

Esterasas de *Lactobacillus plantarum*

Las bacterias lácticas se utilizan frecuentemente en la fermentación de alimentos, por lo que las esterasas de estas bacterias pueden influir significativamente en el aroma final de los productos fermentados obtenidos (13–14). Entre las bacterias lácticas, *Lactobacillus plantarum* es una especie industrialmente importante que se encuentra en la fermentación de numerosos alimentos, como aceitunas, berenjenas, alcaparras, coles, salchichas, queso y vino (12, 15). Además, *L. plantarum* es la especie de bacteria láctica utilizada más frecuentemente como cultivo iniciador en la fermentación de sustratos vegetales, donde los ésteres de compuestos fenólicos son abundantes (12).

A pesar del interés que tienen las enzimas con actividad esterásica, tradicionalmente las esterasas de *L. plantarum* no han sido muy estudiadas. En 1968 se describió por primera vez la presencia de actividad esterasa en *L. plantarum* (16) cuando una cepa de esta especie fue la que presentó la mayor actividad esterasa entre las bacterias lácticas aisladas durante la elaboración de un queso Cheddar. Posteriormente, se purificó parcialmente una enzima con actividad

acetilesterasa a partir de esta cepa (17) la cual, utilizando triacetina como sustrato, presentó actividad óptima a pH 6.7 y 40 °C. Además, se comprobó que la actividad de esta esterasa disminuía según aumenta la longitud de la cadena del ácido graso ensayado (triacetina > tripropionina > tributirina). Casi treinta años después, en 1995, Andersen et al. (1995) (18) purificaron parcialmente y caracterizaron una esterasa a partir de una cepa de *L. plantarum* aislada de una carne fermentada espontáneamente. La enzima, de 75 kDa, presentó actividad óptima a 37 °C utilizando tributirina como sustrato. De manera similar, se aislaron cepas de *L. plantarum* con actividad esterasa entre las cepas de la colección del *National Dairy Products Research* (Cork, Irlanda) (19–20). A partir de una de estas cepas, *L. plantarum* 2739, se purificó y caracterizó una esterasa intracelular, la esterasa E2 (19). Esta esterasa, un monómero de 65 kDa, presentó actividad óptima a pH 7.5 y 35 °C. Entre los triglicéridos ensayados, presentó una mayor actividad frente a tributirina, aunque también hidrolizó trilaurina, tripalmitina y los **ésteres de β -naftilo de los ácidos grasos de C2 a C12, especialmente el butirato de β -naftilo** (19). Posteriormente estos autores describieron que el sistema esterolítico o lipolítico intracelular de *L. plantarum* es muy complejo (20). *L. plantarum* produce dos enzimas mayoritarias que hidrolizan enlaces ésteres carboxílicos con diferente especificidad. Mediante DEAE celulosa, de la esterasa purificada previamente, E2, se consiguió separar una segunda esterasa, E1, y una esterasa minoritaria. Mediante cromatografía en Sephacryl se consiguieron separar otras esterases minoritarias a partir de E2. En esta ocasión la esterasa E2 se comportó como un monómero de 85 kDa con actividad óptima a pH 7.0 y 35 °C sobre los ésteres **de β -naftilo de los ácidos grasos de C2 a C12, especialmente el butirato de β -naftilo**, aunque también hidrolizó la tributirina y, en menor medida, la tricaprilina. La enzima E1 parcialmente purificada fue más activa en tributirina que la enzima E2. Mediante degradación de Edman se determinó la secuencia de los 15 primeros aminoácidos del extremo N-terminal la enzima E2 purificada (SNEHTQEVNQTVAD) (20). Sin embargo, no se realizó la purificación y caracterización de las esterases detectadas.

Contrariamente a las esterases intracelulares descritas en la cepa *L. plantarum* 2739, en *L. plantarum* DSMZ 12028 se describieron lipasas extracelulares (21–23). Se ha descrito que esta cepa produce cuatro lipasas extracelulares, de 45 a 98 kDa, capaces de hidrolizar aceite de oliva, compuesto mayoritariamente por trioleína. Estas enzimas se purificaron parcialmente y se comprobó que poseían una secuencia N-terminal muy similar, por lo que se supuso que se habían originado mediante una degradación proteolítica. Los resultados obtenidos sugieren que existe una metaloproteasa implicada en el procesamiento de las lipasas extracelulares de *L. plantarum* (22).

Más recientemente, en el año 2010, basándose en la secuencia del genoma de la cepa *L. plantarum* WCFS1, se identificó una ORF, *lp_0973*, anotada como posible esterasa. A partir de la cepa de *L. plantarum* ATCC 8014 se clonó y expresó este gen, y se purificó y caracterizó la proteína producida (24). La proteína, de 38 kDa, presentó actividad óptima a pH 6.0 y 40 °C. De los sustratos probados, presentó mayor actividad en butirato de *p*-nitrofenilo, aunque también hidrolizó eficazmente acetato de *p*-nitrofenilo. Mediante dicroísmo circular se estudió la estructura secundaria de esta proteína y se comprobó que presenta un plegamiento **de tipo α/β** (24).

Como se ha podido comprobar en este apartado, a pesar de que las esterases y lipasas son frecuentes en las cepas de *L. plantarum*, sólo una pequeña parte de estas proteínas se han identificado y caracterizado genética y bioquímicamente.

Esterasas de *Lactobacillus plantarum* WCFS1

A pesar de que se han secuenciado numerosos genomas de *L. plantarum* (25), existe escasa información sobre la función de los genes que codifican esterases, así como la contribución de

estas enzimas en el aroma de alimentos y bebidas. La mayoría de proteínas se han anotado en base a la comparación de secuencias con otras proteínas caracterizadas funcionalmente. Sin embargo, se estima que aproximadamente un 40% de las proteínas se encuentran mal anotadas (26). La aproximación experimental definitiva para asignar una función a una proteína es producir y caracterizar bioquímicamente la proteína correspondiente (27). Así mismo, debido al interés industrial de las esterasas y a la dificultad para distinguir entre carboxilesterasas, arilesterasas, lipasas o feruloil esterasas en función de su secuencia (28), la función de estas proteínas se debe confirmar mediante la caracterización bioquímica de la correspondiente proteína.

En las cepas secuenciadas de *L. plantarum* existen numerosas proteínas anotadas como **“esterasas” o “lipasas” o proteínas con actividades similares (acetilesterasa, fosfoesterasa, etc.)**. Además se observa que una misma proteína puede estar anotada con distintas funciones en las distintas cepas de *L. plantarum* lo que indica que su actividad bioquímica no está bien definida y hace necesario un estudio bioquímico exhaustivo para conocer su actividad bioquímica real.

La cepa *L. plantarum* WCFS1 fue la primera cepa de *L. plantarum* cuyo genoma se secuenció completamente (15) y por lo que se ha tomado como modelo para el estudio de las esterasas de esta especie de bacteria láctica. Con algunas de las esterasas de *L. plantarum* WCFS1 se ha realizado un abordaje similar. Los genes que codifican las esterasas se han clonado en vectores de expresión de *E. coli* para facilitar la hiperproducción y purificación de las proteínas recombinantes producidas. Las proteínas recombinantes puras obtenidas se han caracterizado bioquímicamente, comenzando por conocer su especificidad de sustrato.

L. plantarum WCFS1 presenta en su genoma proteínas anotadas como esterasas las cuales se han caracterizado por nuestro grupo. Algunas de estas proteínas son Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_2631, Lp_2923 y Lp_3562, que se encuentran en la mayoría de las cepas de *L. plantarum* secuenciadas. Teniendo en cuenta que las esterasas son muy importantes en las características organolépticas de los alimentos, algunas de las proteínas de *L. plantarum* anotadas como esterasas se han producido de forma recombinante y se han caracterizado bioquímicamente. Con el fin de utilizar estas enzimas en la industria alimentaria, se ha estudiado su actividad enzimática en condiciones físico-químicas encontradas frecuentemente en la elaboración de alimentos (3, 25).

1. Especificidad de sustrato

La actividad esterasa de las proteínas de *L. plantarum* WCFS1 se determinó mediante un método colorimétrico utilizando ésteres derivados de *p*-nitrofenilo con distinta longitud de la cadena acilo (acetato de *p*-nitrofenilo, C2; butirato de *p*-nitrofenilo, C4; caprilato de *p*-nitrofenilo, C8; laurato de *p*-nitrofenilo; miristato de *p*-nitrofenilo C14 y palmitato de *p*-nitrofenilo, C16). Este método también sirve para hacer una primera clasificación de las esterasas entre carboxilesterasas y lipasas. La mayoría de las esterasas actuaron preferentemente sobre ésteres de cadena acilo corta como acetato y butirato de *p*-nitrofenilo (C2-C4) (3, 25, 29-33). La esterasa Lp_3562 hidrolizó además ésteres de cadena acilo larga como miristato y palmitato de *p*-nitrofenilo (C14-C16), por lo que presentaron actividad lipasa (33).

Una vez confirmado que las proteínas presentaban actividad esterasa, se estudió la especificidad de sustrato más detalladamente empleando una colección de 42 ésteres comerciales (29). Los ésteres se eligieron con objeto de identificar la preferencia por la longitud de la cadena y por el grupo alcohol. Además, se incluyeron ésteres fenólicos como el acetato de fenilo, que es sustrato de arilesterasas (34), sustratos de feruloil esterasas (*p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo) (29) y sustratos de tanasas (galato de metilo y protocatecuato de etilo) (Figura 2). Como se observa en la Figura 2, la mayoría de las esterasas hidrolizaron acetato de fenilo, por lo que presentaron actividad arilesterasa (3, 25, 29,

31–33). La proteína Lp_3562 presentó actividad lipasa ya que hidrolizó triglicéridos como la tributirina y la trioleína (34). Previamente se han caracterizado enzimas con actividad lipasa y tributirín esterasa en *L. plantarum* (22)(17). La esterasa Lp_0973 hidrolizó además triacetina (42) mientras que la esterasa Lp_1002 presentó actividad residual sobre la mayoría de los sustratos ensayados (40).

La esterasa Lp_0796 es una feruloil esterasa ya que hidrolizó eficazmente ésteres de ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo). La descripción de actividad feruloil esterasa en la esterasa Lp_0796 constituye la primera descripción de una proteína con esta actividad en *L. plantarum*. Sin embargo, la presencia de esta actividad enzimática se había descrito previamente en otras bacterias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* (35), *Lactobacillus johnsonii* (36), *Lactobacillus helveticus* (37) y *Lactobacillus casei* (38). Además de la caracterización de Lp_0796 como feruloil esterasa, capaz de hidrolizar ésteres de ácidos hidroxicinámicos, también se ha descrito Lp_2956 como tanin acil hidrolasa (tanasa), capaz de hidrolizar ésteres de los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico y ácido protocatéquico). (9). Únicamente se han caracterizado enzimas bacterianas con actividad tanasa en *Staphylococcus lugdunensis* (39), *Streptococcus gallolyticus* (40) y *Atopobium parvulum* (41).

La Tabla 1 muestra la clasificación de las esterases de *L. plantarum* en función de la especificidad de sustrato que presentan. Se puede observar que *L. plantarum* presenta una amplia gama de enzimas con actividad esterasa. Las enzimas arilesterasas, feruloil esterases, tanasas y lipasas descritas podrían utilizarse en la industria alimentaria. Por ejemplo, la arilestera Lp_1002 hidrolizó un amplio rango de sustratos por lo que esta enzima podría ser útil durante la elaboración del vino. De los sustratos estudiados, Lp_1002 hidrolizó compuestos importantes en el aroma como el acetato de etilo (aroma a piña), butanoato de etilo (floral, afrutado), hexanoato de etilo (manzana verde), octanoato de etilo (jamón dulce) y decanoato de etilo (floral) (25). Las lipasas, como Lp_3562, se utilizan en la elaboración de productos lácteos así como también en la fermentación de productos cárnicos (33). Las enzimas con actividad feruloil esterasa (Lp_0796) y tanasa (Lp_2956) se pueden utilizar durante el procesamiento de bebidas y alimentos ricos en compuestos fenólicos para mejorar la calidad del producto final así como para la producción de antioxidantes alimentarios (29, 42).

2. Propiedades bioquímicas

Además de la especificidad de sustrato de las esterases de *L. plantarum* WCFS1, se han estudiado otras propiedades bioquímicas importantes de estas proteínas como el efecto del pH y de la temperatura en su actividad. Como se observa en la Tabla 2, las distintas esterases de *L. plantarum* presentan la actividad óptima a diferentes temperaturas. La arilestera Lp_2631 es una enzima adaptada al frío ya que su temperatura óptima es entre 5–20 °C, constituyendo ésta la primera estera que presenta actividad a bajas temperaturas descrita en *L. plantarum* (3). El resto de esterases analizadas presenta actividad óptima entre 30–37 °C, excepto las esterases Lp_1002 y Lp_3562 cuya temperatura óptima es a 40–45 °C. La existencia en *L. plantarum* de una estera adaptada al frío, como Lp_2631, sugiere que esta estera se puede utilizar en la fermentación de numerosos alimentos, como la elaboración de quesos y productos cárnicos, que tienen lugar a 15 °C (3), así como también en procesos que se lleven a cabo a temperaturas superiores. Además, algunas de las esterases caracterizadas son termoestables. Respecto al pH óptimo para su actividad, la mayoría de las esterases presentaron un pH óptimo a 7.0 (Tabla 2), aunque al pH presente en algunos procesos fermentativos (como en vinificación, pH 3–4) la estera Lp_1002 presenta una actividad adecuada (25).

3. Efecto de aditivos alimentarios

Algunas de las propiedades bioquímicas que presentan las esterasas de *L. plantarum* WCFS1 sugieren que se pueden utilizar en la fermentación de numerosos alimentos ya que presentan actividad en las condiciones de vinificación (Lp_1002 y Lp_2631) o en las del procesamiento de quesos y carnes (Lp_3562 y Lp_2631). Por ello también se realizó un estudio de la actividad esterásica de Lp_1002 y Lp_2631 en presencia de compuestos presentes durante la elaboración del vino (como etanol, metabisulfito sódico y varios ácidos orgánicos como málico, láctico, tartárico y cítrico). En presencia de estos compuestos, las esterasas Lp_1002 (Figura 3) y Lp_2631 presentaron una actividad adecuada en las condiciones de vinificación (3, 25). Durante la elaboración de otros alimentos fermentados, como productos lácteos y cárnicos, se encuentra una elevada concentración de sal (hasta un 20%) por lo que se estudió el efecto de diferentes concentraciones de cloruro sódico en la actividad de la lipasa Lp_3562. Los resultados obtenidos indican que la lipasa Lp_3562 es una proteína halotolerante ya que su actividad no se ve afectada en concentraciones de cloruro sódico tan elevadas como el 25% (33).

Conclusión

L. plantarum posee proteínas con actividad lipasa, arilesterasa, feruloil esterasa y tanasa que pueden actuar durante la elaboración de alimentos y modificar las características organolépticas de los alimentos obtenidos. *L. plantarum* posee además esterasas adaptadas a las condiciones específicas de cada fermentación, como bajas temperaturas, la presencia de etanol, o de sales, por lo que *L. plantarum* es una fuente adecuada de esterasas útiles para la industria alimentaria.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-22745 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Bibliografía

- 1.–Gadagaa, T. H., Mutukumiraa, A. N., Narvhusb, J. A. y Feresuc, S. B. (1999). A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 53:1–11.
- 2.–Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P. y Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:5715–5731.
- 3.–Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014). Characterization of a cold-active esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for food fermentations. *Agricultural Journal of Food Microbiology*, 62:5126–32.
- 4.–Sumby, K. M., Grbin, P. R. y Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121:1–16.
- 5.–Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13:841–866.
- 6.–McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80:293–324.
- 7.–Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. y Schomburg, D. (2009). BRENDA,

AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*, 37:D588–592).

8.– Bornscheuer U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:73–81.

9.– Curiel, J. A., Rodríguez, H., Acebrón, I., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2009). Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:6224–6230.

10.– Benoit, I., Danchin, E. G. J., Bleichrodt, R. J. y de Vries, R. P. (2008). Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters*, 30:387–396.

11.– Panda, T. y Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 160–169.

12.– Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordobés, C., Mancheño, J. M. y Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132:79–90.

13.– Flores, M. y Toldrá, F. (2011). Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22:81–90.

14.– Antalick, G., Perello, M. C. y de Revel, G. (2012). Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:12371–12383.

15.– Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W. E. J., Stiekema, W., Klein Lankhorst, R. M., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Nierop Groot, M. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M. y Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.*, 100:1990–1995.

16.– Otherholm, A., Ordal, Z. J. y Witter, L. D. (1968). Glycerol ester hydrolase activity of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology*, 16:524–527.

17.– Otherholm, A. y Witter, L. D. (1972). Purification and properties of an acetyl ester hydrolase (acetylcetase) from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, 55:6.

18.– Andersen, H. J., Østdal, H. y Blom, H. (1995). Partial purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food Chemistry*, 53:369–373.

19.– Gobetti, M., Fox, P. F., Smacchi, E., Stepaniak, L. y Damiani, P. (1996). Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Food Biochemistry*, 20:227–246.

20.– Gobetti, M., Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1997). Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Dairy Science*, 80:3099–3106.

21.– Silva Lopez, M. F., Cunha, A. E., Clemente, J. J., Teixeira Carrondo, M. J. y Barreto Crespo, M. T. (1999a). Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:249–254.

22.– Silva Lopes, M. F., Leitao, A. L., Figueiredo Marques, J. J., Teixeira Carrondo, M. J. y

Barreto Crespo, M. T. (1999b). Processing of extracellular lipase of *Lactobacillus plantarum* involvement of a metalloprotease. FEMS Microbiology Letters, **176**:483–487.

23.–Silva Lopes, M. F., Leitaó, A. L., Regalla, M., Figueiredo Marques, J. J., Teixeira Carrondo, M. J. y Barreto Crespo, M. T. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology, **76**:107–115.

24.–Brod, F. C., Vernal, J., Bertoldo, J. B., Terenzi, H. y Arisi, A. C. (2010). Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. Molecular Biotechnology, **44**:242–249.

25.–Esteban-Torres, M., Barcenilla, J. M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B y Muñoz, R. (2014). Characterization of a versatile arylesterase from *Lactobacillus plantarum* active on wine esters, **62**:5118–5125.

26.–Green, M. L. y Karp, P. D. A. (2004). Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. BMC Bioinformatics, **5**:76.

27.–Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S. A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C. H., Edwards, A. M. y Yakunin, A. F. (2005). Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. FEMS Microbiology Reviews, **29**: 263–279.

28.–Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. y Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. Biochemie, **82**:1033–1041.

29.–Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2013). Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, **79**:513–5136.

30.–Navarro-González, I., Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F. (2013). Overexpression, purification, and biochemical characterization of the esterase Est0796 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Molecular Biotechnology, **54**:651–660.

31.–Álvarez, Y., Esteban-Torres, M., Cortés-Cabrera, A., Gago, F., Acebrón, I., Benavente, R., Mardo, K., de las Rivas, B., Muñoz, R. y Mancheño, J. M. (2014). Esterase LpEst1 from *Lactobacillus plantarum*: a novel and atypical member of the $\alpha\beta$ hydrolase superfamily of enzymes. Plos One, **9**:e92257. DOI:10.1371/journal.pone.0092257.

32.–Benavente, R., Esteban-Torres, M., Acebrón, I., de las Rivas, B., Muñoz, R. y Mancheño, J.M. (2014). Structure, biochemical characterization and analysis of the pleomorphism of carboxylesterase Cest-2923 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. FEBS Journal. **280**:6658–6671.

33.–Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. LWT-Food Science and Technology. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.063.

34.–Wang, L., Mavisakalyan, V., Tillier, E. R, Clark, G. W., Savchenko, A. V., Yakunin, A. F. y Master, E. R. (2010). Mining bacterial genomes for novel arylesterase activity. Microbial Biotechnology, **3**:677–690.

35.–Wang, X., Geng, X., Egashira, Y. y Sanada, H. (2004). Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, **70**:2367–2372.

- 36.–Lai, K. K., Lorca, G. L. y González, C. F. (2009). Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:5018–5024.
- 37.–Fenster, K. M., Parkin, K. L. y Steele, J. L. (2000). Characterization of an arylesterase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Applied Microbiology* 88:572–583.
- 38.–Fenster, K. M., Parkin, K. L. y Steele, J. L. (2003). Nucleotide sequencing, purification, and biochemical properties of an arylesterase from *Lactobacillus casei* LILA. *Journal of Dairy Science*, 86:2547–2557.
- 39.–Noguchi, N., Ohashi, T., Shiratori, T., Narui, K., Hagiwara, T., K, M., Watanabe, K., Miyahara, T., Taira, S. y Moriyasu, F. (2007). Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. *Journal of Gastroenterology*, 42:346–351.
- 40.–Jiménez, N., Barcenilla, J. M., de Felipe, F. L., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014). Characterization of a bacterial tannase from *Streptococcus gallolyticus* UCN34 suitable for tannin biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:6329–37.
- 41.–Jiménez, N., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2014). Contribution of a tannase from *Atopobium parvulum* DSM 20469^T in the oral processing of food tannins. *Food Research International*, 62:397–402.
- 42.– Boadi, D. K. y Neufeld, R. J. (2001). Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:590–595.

Tabla 1. Esterasas de *L. plantarum* WCFS1

Esterasa	Tipo	Especificidad de sustrato
Lp_0796	Feruloil esterasa	<i>p</i> -Cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo
Lp_0973	Arilesterasa	Acetato de fenilo
Lp_1002	Arilesterasa	Acetato de fenilo
Lp_1760	Tributirín esterasa	Tributirina
Lp_2631	Arilesterasa	Acetato de fenilo
Lp_2923	Arilesterasa	Acetato de fenilo
Lp_2956	Tanasa	Galato de metilo y Protocatecuato de etilo
Lp_3562	Lipasa	Tributirina, trioleína

Tabla 2. Propiedades de esterasas de *L. plantarum* WCFS1

Características	Lp_0796	Lp_0973	Lp_1002	Lp_2631	Lp_2923	Lp_2956	Lp_3562
Tipo ^a	FE	AE	AE	AE	AE	TA	LP
Peso molecular (kDa)	27.9	36.8	28.7	28.4	30.4	51	30.9
Punto isoeléctrico	5.6	4.7	5.7	6.1	6.3	6.2	5.2
mg proteína/L de cultivo	13	13	20	8	20	17	25
Temperatura óptima (°C)	30–37	30	40	5–20	30	40	40
pH óptimo	7.0	6.5–7.0	5.0–7.0	6.5	7.0–8.0	7.0	7.0
Termoestabilidad (°C)	20–37	20–30	20–45	20–30	20–55	25–37	20–45
Activadores	ZnCl ₂ , Tween 20, Tween 80	Tween 20, Tween 80,	CaCl ₂ , MnCl ₂ ,	MnCl ₂ , Tween 2, Tween 80	kCl, CaCl ₂ , ZnCl ₂	CaCl ₂	NiCl ₂ , MnCl ₂
Inhibidores	HgCl ₂ , SDS, PMSF, KCl	HgCl ₂ , SDS, PMSF	HgCl ₂ , CuCl ₂ , NiCl ₂	HgCl ₂ , CuCl ₂ , N	HgCl ₂ , SDS	β-mercaptoetanol, HgCl ₂	HgCl ₂ , CuCl ₂ , SDS
<u>Substratos^b</u>							
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	75	100	100	100	100	ND	100
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	100	22	10	50	40	ND	41
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	30	1	8	2	25	ND	32
Laurato de <i>p</i> -nitrofenilo	7	1	8	2	17	ND	30
Miristato de <i>p</i> -nitrofenilo	7	2	6	2	15	ND	45
Palmitato de <i>p</i> -nitrofenilo	20	1	1	2	17	ND	12
<i>p</i> -Cumarato de metilo	64	6	3	0	1	3	0
Cafeato de metilo	80	4	3	0	1	3	0
Ferulato de metilo	50	1	4	0	1	6	0
Sinapinato de metilo	35	1	5	0	1	5	0
Galato de metilo	0	6	3	0	4	100	0
3,4-Dihidroxibenzoato de etilo	0	8	6	0	3	90	0
Acetato de fenilo	100	87	100	100	100	50	45
Acetato de etilo	8	8	18	0	4	8	6
Butanoato de etilo	7	5	15	0	4	6	0
Hexanoato de etilo	11	0	13	0	3	ND	0
Octanoato de etilo	7	4	11	0	3	ND	0
Triacetina	12	100	8	0	5	ND	0
Tributirina	14	28	4	0	5	ND	100
Trilaurina	3	4	5	0	3	ND	4

^a FE, feruloil esterase; AE, arilesterasa; TA, tanasa; LP, lipasa.

^b Actividad relativa (%); ND, no determinado.

Figura 1

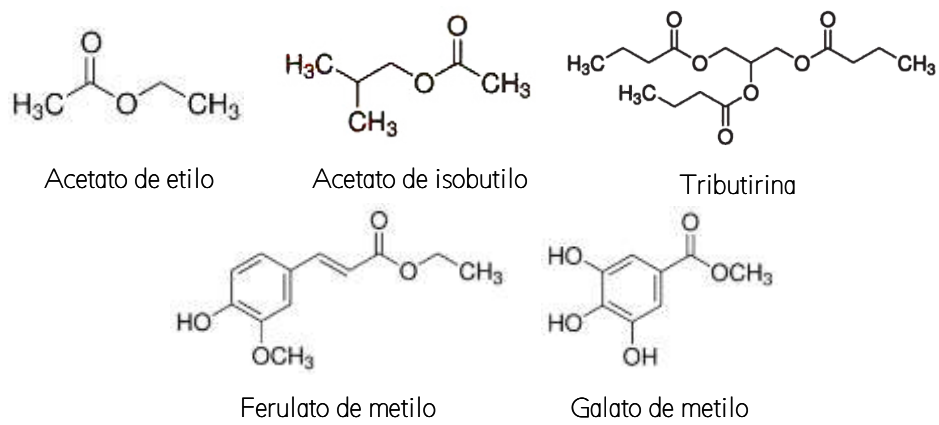


Figura 1. Estructura de algunos ésteres presentes en alimentos

Figura 2

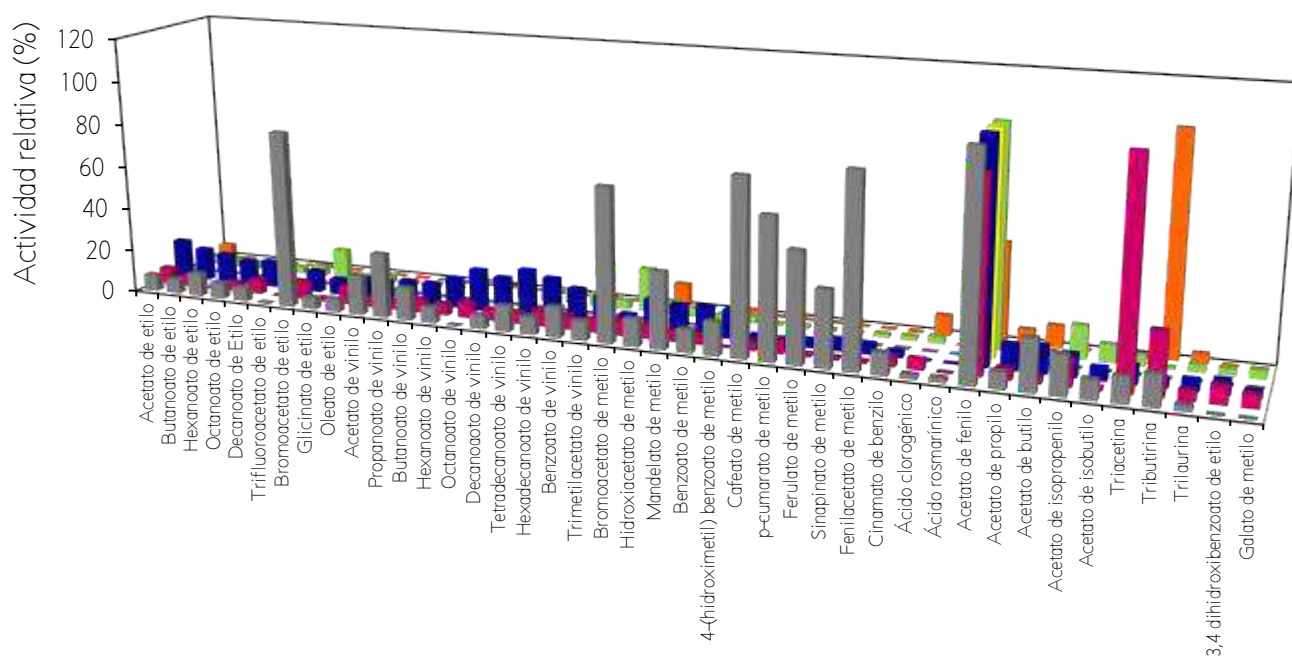


Figura 2. Especificidad de sustratos de algunas esterases de *L. plantarum* WCFS1. Se muestran los resultados obtenidos con las esterases Lp_0796 (gris), Lp_0973 (rosa), Lp_1002 (azul), Lp_2631 (amarillo), Lp_2913 (verde) y Lp_3562 (naranja).

Figura 3

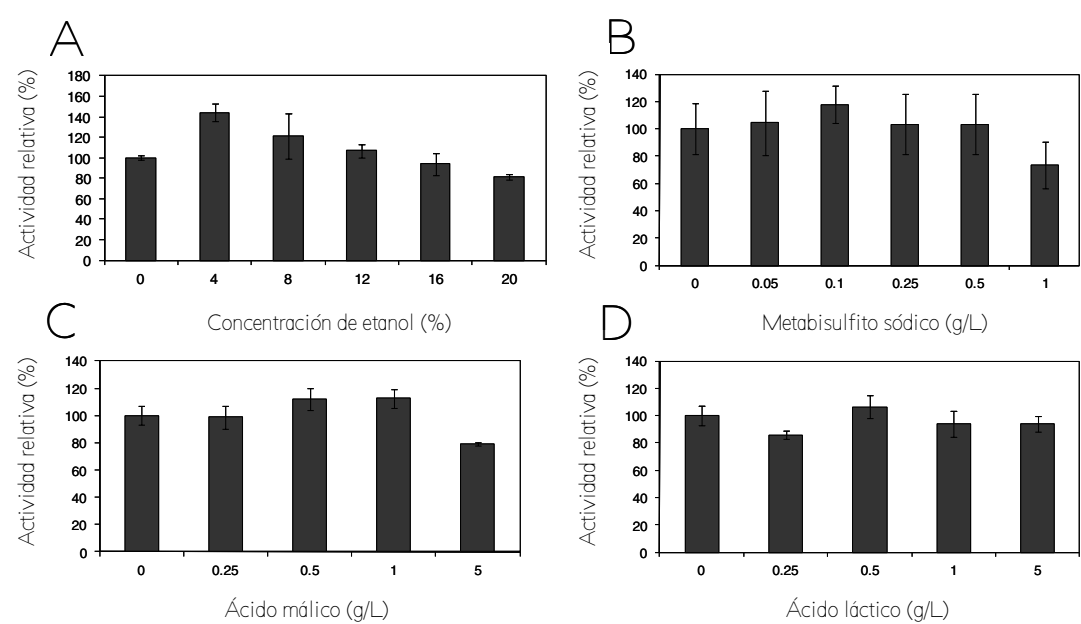


Figura 3. Efecto de etanol (A), metabisulfito sódico (B), ácido málico (C) y ácido láctico (D) en la actividad arilesterasa de Lp_1002 de *L. plantarum* WCFS1